

APLIKASI *FOURIER TRANSFORM INFRARED* (FTIR) DAN PENGAMATAN PEMBENGKAKAN GENITAL PADA SPESIES PRIMATA, LUTUNG JAWA (*Trachypithecus auratus*) UNTUK MENDETEKSI MASA SUBUR

Fourier Transform Infrared (FTIR) Application and Genital Observation in Detecting Primate Species, Javan Langur's (Trachypithecus Auratus) Fertility

Luthfirda Sjahfirdi¹, Nikki Aldi¹, Hera Maheshwari², dan Pudji Astuti³

¹Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, Jakarta

²Departemen Anatomi Fisiologi dan Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

³Departemen Fisiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

E-mail: luthfirda@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui gugus fungsi penanda yang merepresentasikan hormon metabolit E₁C dan PdG serta bilangan gelombangnya pada urine yang didukung dengan pengamatan genitalia untuk memastikan pendeteksian masa subur pada lutung jawa (*Trachypithecus auratus*). Sampel urine dan pengamatan genitalia diperoleh dari 2 (dua) ekor lutung jawa betina di Pusat Primata Schmutzer, Kebun Binatang Ragunan, Jakarta. Sampel urin diambil setiap hari dan dilengkapi dengan pengamatan genitalia. Hasil menunjukkan bahwa gugus fungsi penanda yang merepresentasikan E₁C dan PdG pada lutung jawa sama dengan yang teridentifikasi pada tikus namun dengan bilangan gelombang berbeda. Hormon metabolit E₁C direpresentasikan melalui gugus fungsi alkil, aromatik, dan hidroksil pada bilangan gelombang 596 cm⁻¹, 698 cm⁻¹, 3599 cm⁻¹, dan PdG direpresentasikan melalui gugus fungsi alkil dan aldehid pada bilangan gelombang 1450 dan 1699 cm⁻¹. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa gugus fungsi penanda yang teridentifikasi oleh *fourier transform infrared* (FTIR) dapat berlaku secara universal, namun bilangan gelombang yang merepresentasikannya bersifat spesifik spesies.

Kata kunci: bilangan gelombang, FTIR, gugus fungsi, masa subur, *Trachypithecus auratus*

ABSTRACT

A research has been conducted regarding the use of FTIR (Fourier Transform Infrared) to detect presence of E₁C and PdG metabolic hormones, as well as genital observation in detecting javan langur's (*Trachypithecus auratus*) fertility. The objective of the research was to find out the determining functional groups, representing E₁C and PdG metabolic hormones and the wave numbers in the urine specimen and supported with genital observation to ensure the sign of the primate's fertility. The given information will complete the data on the existing laboratory rat. Once the result on primates become available, we can determine the ability of the FTIR in detecting fertility period in primates and whether it is universally applied in the species of primates. Urine sample and genital observation were obtained from 2 (two) javan langur at the Schmutzer Primate Center, Ragunan Zoo, Jakarta. Collection of the data was conducted everyday from the period of July until December of 2011. Result shows that marks of functional groups that represents E₁C and PdG on javan langur resemble data on lab rat with different wave numbers. The E₁C was represented through functional groups of alkyl, aromatic, and hydroxyl in wave numbers of 596 cm⁻¹, 698 cm⁻¹, and 3599 cm⁻¹ and PdG was represented through functional groups of alkyl and aldehyde on wave numbers 1450 cm⁻¹ and 1699 cm⁻¹. In conclusion, the marks of functional groups or known as the FTIR, is applicable universally, however the wave numbers depended upon specific species.

Key words: wave number, FTIR, functional group, fertile phase, *Trachypithecus auratus*

PENDAHULUAN

Lutung jawa sebagai salah satu spesies yang endemik di Indonesia, khususnya pulau Jawa, menjadi salah satu spesies primata yang dilindungi. Lutung jawa termasuk ke dalam Apendiks II Convention on International Trade in Endangered Species (CITES) yang berarti pendistribusiannya hanya terbatas untuk penelitian (CITES, 2003) meski hal tersebut tidak menghalangi pendistribusian ilegal pada lutung jawa. Populasi lutung jawa memiliki kecenderungan menurun dari waktu ke waktu sehingga International Union of Conservation of Nature (IUCN) menggolongkan lutung jawa sebagai spesies yang rentan akan kepunahan. Meskipun rentan terhadap kepunahan, lutung jawa telah mencapai hingga tiga generasi, yang setiap generasinya mencakup 12 tahun kehidupan (IUCN, 2012).

Salah satu cara untuk mengatasi menurunnya populasi suatu spesies adalah meningkatkan efektivitas dalam

bereproduksi. Penyeleksian satwa yang siap kawin dapat dilakukan dengan mudah melalui pemantauan masa subur dengan beberapa metode kualitatif, antara lain melalui preparat ulas vagina (Maeda *et al.*, 2000) dan pengamatan genitalia (Heistermann *et al.*, 1996), sedangkan cara yang bersifat kuantitatif adalah dengan pengukuran kadar hormon. Kadar hormon dapat diukur dengan berbagai metode, seperti metode *enzyme immunoassays* (EIA) dan *radio immunoassays* (RIA). Metode kuantitatif tersebut telah diuji untuk pengukuran kadar hormon Shideler *et al.* (1993) dengan menggunakan EIA untuk mengukur hormon metabolit steroid ovarium monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) dan Nadler *et al.* (1992) dengan menggunakan RIA untuk mengukur kadar hormon seksual owa (*Hylobates moloch*). Dengan mengetahui periode masa subur, hewan dapat dikawinkan secara alami pada periode suburnya dan diharapkan menghasilkan keturunan untuk meningkatkan jumlah populasinya.

Pada penelitian ini, digunakan metode *fourier transform infrared* (FTIR) yang merupakan metode bebas reagen, tanpa penggunaan radioaktif dan dapat mengukur kadar hormon secara kualitatif dan kuantitatif. Prinsip kerja FTIR adalah mengenali gugus fungsi suatu senyawa dari absorbansi inframerah yang dilakukan terhadap senyawa tersebut. Pola absorbansi yang diserap oleh tiap-tiap senyawa berbeda-beda, sehingga senyawa-senyawa dapat dibedakan dan dikuantifikasikan (Sankari, 2010). Metode FTIR telah diuji cobakan oleh Sjahfirdi *et al.* (2011a) untuk mendeteksi siklus estrus pada tikus (*Rattus norvegicus*) baik menggunakan sampel darah (Sjahfirdi *et al.*, 2011a) maupun urine (Sjahfirdi *et al.*, 2011b) pada tikus betina dan hasilnya berupa perbedaan antara estrus dan non-estrus yang jelas sehingga dapat ditentukan masa subur hewan uji tikus tersebut.

Penelitian ini bertujuan menguji kemampuan FTIR mendeteksi gugus fungsi penanda hormon metabolit *estrone conjugate* (E_1C) dan *pregnenediol glucuronide* (PdG) pada urine spesies hewan selain hewan uji rodensia. Pada penelitian ini digunakan hewan primata, yaitu lutung jawa sebagai salah satu primata endemik pulau Jawa. Metode FTIR akan dikombinasikan dengan metode pengamatan genitalia yang umum dipakai dalam mendeteksi masa subur. Hasil yang didapat akan memberikan informasi penilaian FTIR terhadap hormon metabolit E_1C dan PdG apakah bersifat universal atau spesifik pada spesies tertentu (*species specific*) yang dapat dipakai untuk menentukan masa subur primata. Diharapkan dengan mengaplikasikan metode FTIR pada sampel yang diambil secara non-invasif, dapat memudahkan upaya konservasi hewan endemik khususnya, melalui pendeteksian masa subur sehingga dapat ditingkatkan jumlah populasinya melalui perkawinan alami di penangkaran.

MATERI DAN METODE

Penelitian dilakukan di Taman Margasatwa Ragunan, Jakarta dan Laboratorium Afiliasi Departemen Kimia FMIPA UI. Pengambilan data pengamatan genitalia dilakukan setiap hari melalui pengamatan dari luar kandang peraga dan diupayakan tidak memengaruhi aktivitas satwa yang diamati. Urine diambil dari kandang peraga, pada saat hewan telah digiring ke dalam kandang

sekat. Setelah pencatatan hasil pengamatan genitalia dan pengambilan sampel urine selesai, seluruh sampel urine dibawa ke laboratorium untuk dianalisis menggunakan perangkat FTIR.

Lutung jawa yang diteliti berjumlah dua ekor dengan jenis kelamin betina. Betina yang pertama (♀1) bernama Dina berumur 4 tahun, dan betina yang kedua (♀2) bernama Dini berumur tiga tahun. Bobot badan keduanya diperkirakan sekitar 5-6 kg, dengan tinggi dari ujung kepala sampai tungging adalah sekitar 50 cm dan panjang ekor sekitar 70 cm.

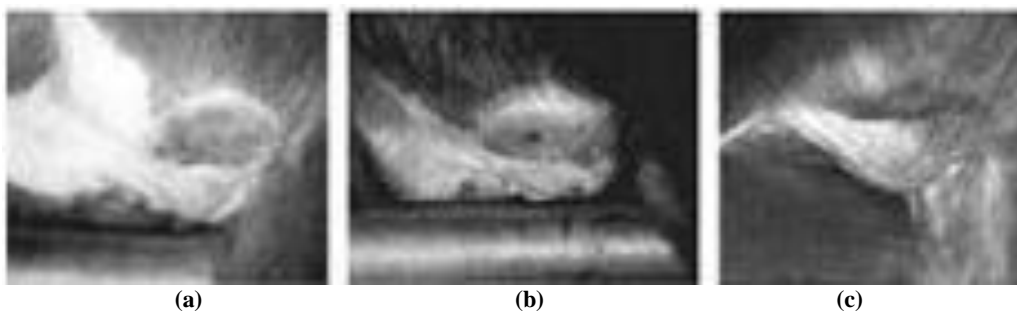
Kandang pemeliharaan lutung jawa terbagi menjadi dua, yaitu kandang sekat dan kandang peraga. Ukuran kandang keseluruhan yaitu sekitar 9x5x8 m. Kandang peraga terdiri atas sebuah tangga, bak tempat minum, pohon-pohon buatan, tali-tali dan rantai untuk berayun. Kandang sekat terdiri dari pohon buatan serta kandang kayu.

Koleksi Sampel Urine

Pengumpulan sampel urine dilakukan secara non-invasif, yaitu sampel diambil dari lantai kandang peraga menggunakan *sputit* dan jarum. Urine diambil setelah kedua ekor lutung jawa melakukan urineasi setiap pagi selama 30 hari antara pukul 08.00-10.00 WIB. Pada saat tersebut, *keepers* akan menggiring kedua lutung jawa menuju kandang sekat sehingga urine dalam kandang peraga dapat dikumpulkan. Sampel urine yang dikumpulkan kemudian ditaruh dalam plastik *ziplock* dan disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 8° C (Shideler *et al.*, 1993). Sampel urine dikumpulkan untuk dianalisis menggunakan FTIR (FTIR IR Prestige-21, Shimadzu).

Pengamatan Genitalia

Fase siklus estrus setiap ekor lutung jawa ditentukan dengan pengamatan genitalia. Genital dari lutung jawa diamati morfologinya dan diberikan skor. Skor + menandakan belum terjadi pembengkakan, skor ++ mulai ada pembengkakan, skor +++ menandakan pembengkakan sempurna. Masa estrus dari lutung jawa ditandai dengan pembengkakan sempurna pada organ genitalia (Wolfe-Coote, 2005). Hasil pengamatan didokumentasikan menggunakan kamera digital (Gambar 1). Prosedur tersebut dilakukan dalam waktu 30 hari dan data diambil setiap hari dari kedua ekor lutung jawa betina yang ada.



Gambar 1. Acuan pembengkakan genital (Zinner, 2007) (a= Belum terjadi pembengkakan (+); ukuran labia minora kecil dan kerutan maksimal; b= Sebagian membengkak (++), ukuran labia minora membesar dan kerutan mulai menghilang; c= Pembengkakan sempurna (+++), ukuran labia minora maksimal tanpa ada kerutan, Heistermann *et al.*, 1996).

Analisis FTIR

Sampel urine yang telah didapatkan dianalisis dengan menggunakan mesin FTIR. Sampel urine diambil sebesar 0,5 μ l dan dilakukan prosedur FTIR dengan menembakkan sinar inframerah hingga mendapatkan hasil berupa spektrum inframerah. Untuk mengetahui masa estrus dan non-estrus pada sampel urine lutung jawa, dicari representasi dari hormon metabolit E_1C dan PdG melalui puncak-puncak yang khas pada spektrum.

Untuk mencari puncak-puncak yang khas dari gugus fungsi spesifik milik E_1C dan PdG, digunakan kisaran bilangan gelombang 400-4000 cm^{-1} (Smith, 1979). Berdasarkan penelitian Sjahfirdi *et al.* (2011b) telah didapatkan gugus fungsi spesifik E_1C dan PdG pada urine tikus. Gugus E_1C direpresentasikan oleh gugus alkil, aromatic, dan hidroksil pada bilangan gelombang 416, 709, dan 3468 cm^{-1} sedangkan PdG direpresentasikan oleh gugus aldehid, alkil, dan asam karboksilat pada bilangan gelombang 1639, 1379, dan 1745 cm^{-1} . Data tersebut digunakan untuk mengetahui bilangan gelombang dan nilai absorbansi dari gugus fungsi spesifik E_1C dan PdG pada lutung jawa.

Dalam menentukan nilai absorbansi E_1C dan PdG pada lutung jawa tersebut, diperlukan faktor koreksi pada sampel FTIR. Faktor koreksi yang digunakan untuk sampel urine adalah kreatinin (Cr), sebab kreatinin merupakan salah satu senyawa yang memiliki kadar relatif konstan dalam urine untuk setiap individu (Strasinger dan Lorenzo, 2008). Hasil yang akan didapat berupa nilai absorbansi dari E_1C dan PdG. Nilai absorbansi tersebut kemudian dikorelasikan dengan data pengamatan genitalia.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan Pembengkakan Genitalia

Pembengkakan genitalia merupakan manifestasi memuncaknya kadar hormon estrogen pada betina yang menandai betina berada pada masa subur atau pada kondisi estrus dan siap dibuahi oleh jantan. Setelah kondisi estrus terlampaui, betina tidak lagi berada pada masa dapat dibuahi dan kondisi tersebut dikenal dengan kondisi non-estrus, yang merupakan menurunnya secara drastis kadar hormon estrogen dalam darah. Seiring dengan menurunnya kadar estrogen, akan meningkat kadar hormon progesteron. Sirkulasi kadar progesteron dalam darah merupakan saat betina berada pada kondisi non-estrus. Pada pengamatan pembengkakan genitalia, pembengkakan maksimal tidak dapat terdeteksi sesuai dengan Gambar 1 yang diperlihatkan oleh Zinner (2007), namun pembengkakan parsial (sebagian) dapat terdeteksi (Gambar 2). Hal tersebut dapat terjadi karena lokasi hewan berada di kebun binatang dan kemungkinan mendapat tekanan lingkungan. Selain itu, tidak terdapatnya jantan dalam kandang menyebabkan respons fisiologis menjelang masa subur (estrus) tidak optimal. Shelmidine *et al.* (2007) juga telah meneliti pembengkakan genital dari spesies *T. cristatus* di kebun

binatang Bronx dan tidak menemukan adanya pola pembengkakan yang berbeda nyata saat estrus dibanding saat non-estrus karena ketiadaan jantan.



Gambar 2. Pembengkakan sebagian pada genitalia lutung jawa

Analisis Hormon Metabolit pada Sampel Urine

Untuk menganalisis keberadaan hormon estrogen dan progesteron yang bersirkulasi dalam tubuh, digunakan hormon metabolitnya yang dapat diukur dalam urine. Hormon metabolit estrogen yang sampai pada urine adalah E_1C dan hormon metabolit progesteron adalah PdG.

Dari 42 sampel urine yang didapat dan telah dianalisis dengan FTIR, diketahui bahwa terjadi fluktuasi nilai absorbansi dari E_1C dan PdG. Pada data yang didapatkan, terdapat beberapa data yang menunjukkan nilai absorbansi yang tinggi pada E_1C namun kemudian menurun pada data lainnya dan hal tersebut juga terjadi pada data PdG. Pada hari tertentu, didapatkan nilai absorbansi E_1C yang sangat tinggi, diselingi menurunnya nilai absorbansi E_1C pada hari-hari berikutnya. Nilai yang sangat tinggi tersebut dapat diasosiasikan dengan pemuncakan nilai estrogen yang merupakan ciri dari peristiwa estrus pada masa subur. Fenomena fluktuasi dan pemuncakan nilai absorbansi yang didapatkan sesuai dengan profil hormon umum (Guyton dan Hall, 2006).

Analisis Kreatinin (Cr)

Gugus fungsi yang merepresentasikan kreatinin adalah keton. Hasil yang didapatkan untuk menunjukkan gugus fungsi kreatinin pada sampel urine lutung jawa adalah pada bilangan gelombang 1708 cm^{-1} . Nilai rerata dengan standar deviasi relatif kecil yang didapatkan, adalah $0,34 \pm 0,027$ (saat estrus) dan $0,346 \pm 0,034$ (saat non-estrus), yang menunjukkan bahwa nilai kreatinin dapat dinyatakan konstan (Strasinger dan Lorenzo, 2008).

Analisis E_1C

Gugus fungsi yang dapat merepresentasikan E_1C pada penelitian ini adalah gugus fungsi aromatik, hidroksil, dan alkil, sama dengan gugus fungsi yang diperoleh pada tikus oleh Sjahfirdi *et al.* (2011b). Hasil yang didapatkan untuk bilangan gelombang yang menunjukkan gugus fungsi spesifik pada E_1C berturut-turut adalah pada lutung jawa adalah pada gugus alkil 698 cm^{-1} , pada gugus hidroksil 3599 cm^{-1} , dan pada gugus alkil 596 cm^{-1} . Pada penelitian Sjahfirdi *et al.*

(2011b) bilangan gelombang yang diperoleh berbeda untuk masing-masing gugus fungsi, namun masih berada dalam kisaran yang ditentukan oleh Smith (1979).

Nilai absorbansi yang didapat menunjukkan adanya perbedaan antara kondisi saat estrus dan non-estrus. Pada saat estrus, E₁C memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan saat non-estrus. Untuk gugus fungsi aromatik, saat estrus nilainya adalah 3,446% sedangkan non-estrus adalah 1,809%; untuk gugus fungsi hidroksil, saat estrus nilainya adalah 5,862% sedangkan saat non-estrus adalah 2,228%; dan untuk gugus fungsi alkil, saat estrus nilainya adalah 2,533% sedangkan non-estrus adalah 1,698%. Perbandingan kondisi estrus dengan non-estrus untuk gugus fungsi aromatik adalah 1,905 : 1; untuk gugus fungsi hidroksil adalah 2,631 : 1; dan untuk gugus fungsi alkil adalah 2,394 : 1. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa gugus fungsi yang paling dapat menunjukkan perbedaan estrus dan non-estrus, berdasarkan nilai terbesar, adalah gugus fungsi hidroksil. Nilai gugus fungsi hidroksil untuk lutung jawa adalah 5,862% berbanding 2,228% atau nilai absorbansi E₁C saat estrus 2,631 kali lebih tinggi dibandingkan saat non-estrus.

Analisis PdG

Penelitian pada tikus yang merepresentasikan gugus fungsi PdG berturut-turut adalah gugus fungsi alkil, aldehyd, dan asam karboksilat berturut-turut pada bilangan gelombang 1379, 1639 dan 1745 cm⁻¹ (Sjahfirdi *et al.*, 2011b). Pada lutung jawa diperoleh gugus fungsi yang merepresentasikan PdG adalah gugus fungsi alkil dan aldehyd. Pada bilangan gelombang yang merepresentasikan gugus fungsi asam karboksilat, ada beberapa sampel yang tidak dapat mengabsorbansi cahaya (Babin dan Stramski, 2002) pada keseluruhan bilangan gelombang yang mengidentifikasi asam karboksilat, yaitu antara 1735-1750 cm⁻¹ (Smith, 1979) sehingga bilangan gelombang yang merepresentasikan gugus fungsi asam karboksilat tidak digunakan. Nilai absorbansi yang diperoleh untuk gugus fungsi alkil dan aldehyd adalah 1450 dan 1699 cm⁻¹. Nilai absorbansi yang diperoleh ini berbeda dengan nilai yang diperoleh melalui penelitian Sjahfirdi *et al.* (2011b), meski masih berada dalam kisaran yang ditentukan oleh Smith (1979).

Nilai PdG memiliki nilai absorbansi yang lebih rendah saat estrus dibandingkan saat non-estrus. Nilai absorbansi yang didapat menunjukkan adanya perbedaan antara kondisi estrus dengan non-estrus. Pada saat estrus, PdG memiliki nilai yang lebih rendah dibandingkan saat non-estrus. Untuk gugus fungsi alkil, saat estrus nilainya adalah 0,615% sedangkan non-estrus adalah 2,037%; dan untuk gugus fungsi aldehyd, saat estrus nilainya adalah 0,709% sedangkan non-estrus adalah 2,438%. Perbandingan kondisi estrus dengan non-estrus untuk gugus fungsi alkil adalah 1 : 3,312; dan untuk gugus fungsi aldehyd adalah 1 : 3,439. Bila estrogen tinggi maka progesteron akan rendah. Maka dari itu, kondisi estrus, yang ditandai dengan tingginya kadar estrogen

akan ditandai pula dengan rendahnya kadar progesteron reproduksi (Guyton dan Hall, 2006). Hasil yang didapatkan juga menunjukkan bahwa gugus fungsi yang paling dapat menunjukkan perbedaan saat estrus dan non-estrus, berdasarkan nilai terendah, adalah gugus fungsi aldehyd. Nilai gugus fungsi aldehyd lutung jawa adalah 0,709 : 2,348 atau saat estrus, nilai absorbansi PdG adalah 3,439 lebih rendah dari saat non-estrus.

Analisis Korelasi Pengamatan Genitalia dengan FTIR

Data pembengkakan yang dibandingkan adalah data pembengkakan yang memiliki data urine untuk dibandingkan. Data urine untuk pembanding adalah data urine dengan nilai absorbansi yang paling menunjukkan adanya perbedaan estrus dan non-estrus. Data urine tersebut yaitu data E₁C/kreatinin dengan gugus fungsi yang mewakili E₁C adalah hidroksil. Data urine untuk PdG/kreatinin adalah PdG dengan gugus fungsi yang mewakili adalah gugus fungsi aldehyd.

Data perbandingan antara data pembengkakan pada ♀1 dengan data urine menunjukkan sebagian data yang didapat sesuai dengan penelitian Heistermann *et al.* (1996), yaitu terdapat korelasi positif antara data pembengkakan yang diamati dengan kadar E₁C yang diukur. Kondisi estrus tercapai pada absorbansi E₁C yang tinggi yaitu bernilai 5%. Meski demikian, beberapa data menunjukkan hal yang berlawanan, data E₁C yang tinggi ataupun rendah memiliki data pembengkakan yang memiliki skor + (tidak membengkak) ataupun ++ (membengkak sebagian). Contohnya adalah pada tanggal 22 Agustus, ketika nilai E₁C yang kecil menunjukkan adanya pembengkakan sebagian dan pada tanggal 20 September, ketika nilai E₁C yang relatif tinggi tetapi tidak menunjukkan adanya pembengkakan. Hal tersebut mungkin dapat terjadi karena kurang jelasnya signifikansi perubahan pembengkakan yang teramati.

Data perbandingan antara data pembengkakan pada ♀2 dengan data urine menunjukkan data sesuai dengan penelitian Heistermann *et al.* (1996), yaitu terdapat korelasi positif antara data pembengkakan yang diamati dengan kadar E₁C yang diukur. Hal tersebut dapat terlihat pada nilai yang tinggi pada E₁C/kreatinin dan rendah pada PdG/kreatinin menunjukkan adanya pembengkakan parsial. Dari data ini juga menunjukkan batas ketinggian nilai absorbansi untuk menunjukkan pembengkakan adalah 4,731 yang berarti telah memasuki masa estrus.

Melalui FTIR didapatkan nilai absorbansi untuk E₁C, yang paling optimal ditunjukkan oleh gugus fungsi hidroksil, dengan perbedaan saat estrus adalah 2,631 kali lebih tinggi dibanding saat non-estrus; sedangkan nilai absorbansi PdG, yang paling optimal ditunjukkan oleh gugus fungsi aldehyd, dengan saat estrus lebih rendah 3,439 dibanding saat non-estrus. Perbandingan antara data FTIR dan data pembengkakan genitalia menunjukkan nilai absorbansi terkecil yang menunjukkan adanya pembengkakan genitalia, berdasarkan kadar hormon metabolit E₁C adalah 4,731.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa terdapat korelasi positif antara data pembengkakan yang diamati dengan kadar E₁C dan PdG yang diukur melalui FTIR yang dapat merepresentasikan kesuburan hewan.

DAFTAR PUSTAKA

- Babin, M. and D. Stramski. 2002. Light absorption by aquatic particles in the near-infrared spectral region. **American Soc. Limnol. Ocean.** 47(3):911-915.
- CITES (Convention on International Trade in Endangered Species). 2003. **Checklist of CITES Species**. UNEP World Conservation Monitoring Centre. Geneva, Switzerland.
- Guyton, A.C. and J.E. Hall. 2006. **Textbook of Medical Physiology**. 12th ed. Elsevier Inc., USA.
- Heistermann, M., U. Mohle, H. Vervaecke, L. v. Elsacker, J.K. Hodges. 1996. Application of urine and fecal steroid measurements for monitoring ovarian excretion and pregnancy in the bonobo (*Pan paniscus*) and evaluation of perineal swelling patterns in relation to endocrine events. **Biol. Reproduct.** 55:844-853.
- IUCN (International Union of Conservation of Nature). 2012. *Trachypithecus auratus*. <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/22034/0>.
- IUCN (International Union of Conservation of Nature). 2008. *Trachypithecus auratus*. <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/22034/0>.
- Maeda, K., S. Ohkura, and H. Tsukamura. 2000. Physiology of Reproduction. In **The Handbook of Experimental Animals: The Laboratory Rat**. Krinke, G.J. (Ed.). Academic Press, London.
- Nadler, R.D., J.F. Dahl, and D.C. Collins. 1992. Serum and urinary concentrations of sex hormones and genital swelling during the menstrual cycle of the gibbon. **J. Endocrinol.** 136:447-455.
- Sankari, G., E. Kriahnamoorthy, S. Jayakumaran, S. Gunasekaran, V.V. Priya, S. Subramaniam, S. Subramaniam, and S.K. Mohan. 2010. Analysis of serum immunoglobulins using fourier transform infrared spectral measurements. **Biol. Med.** 2(3):42-48.
- Sheldine, N., C. Borries, A. Koenig. 2007. Genital swellings in silvered langurs: What do they indicate? **Am. J. Primatol.** 69(5):519-532.
- Shideler, S.E., C.H.L. Shackleton, F.M. Moran, P. Stauffer, P.N. Lohstroh, and B.L. Lasley. 1993. Enzyme immunoassays for ovarian steroid metabolites in the urine of *Macaca fascicularis*. **J. Med. Primatol.** 22:301-312.
- Shideler, S.E., C.H.L. Shackleton, F.M. Moran, P. Stauffer, P.N. Lohstroh, and B.L. Lasley. 1993. Enzyme immunoassays for ovarian steroid metabolites in the urine of *Macaca fascicularis*. **J. Med. Primatol.** 22:301-312.
- Sjahfirdi, L., A. Septian, H. Maheswari, P. Astuti, F.D. Suyatna, and M. Nasikin. 2011a. Determination of estrus period in female rats (*Rattus norvegicus*) by fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy through identification of reproductive hormone in blood samples. **World Appl. Sci. J.** 14(4):539-545.
- Sjahfirdi, L., S. N. Azis, H. Maheswari, P. Astuti, F.D. Suyatna, and M. Nasikin. 2011b. Estrus period determination of female rats (*Rattus norvegicus*) by Fourier Transform Infrared (FTIR) through identification of reproductive hormone metabolites in urine samples. **Int. J. Basic Appl. Sci.** 11(3):158-163.
- Smith, A. L. 1979. **Applied Infrared Spectroscopy**. John Wiley, New York.
- Strasinger, K.S. and M.S. Lorenzo. 2008. **Urinalysis and Body Fluids**. F.A. Davis Company, Philadelphia.
- Wolfe-Coote, S. 2005. **The Handbook of Experimental Animals: The Laboratory Primate**. Elsevier Inc., USA.
- Zinner, D. 2007. **Sexual Swelling in Female Primates: Fact and Hypothesis**. Deutsches Primatenzentrum (German Primate Center), Göttingen.